

Title

Fermentative production of amino acids

Inventor Name

Shiio, Isao,; Ohtsuka, Shinichiro; Kurasawa, Shogo; Uchio, Ryosuke

Patent Assignee

Ajinomoto Co., Inc., Japan

Publication Source

Jpn. Kokoku Tokkyo Koho, 6 pp.

Patent Information

| PATENT NO. | KIND | DATE | APPLICATION NO. | DATE |
|-------------|------|----------|-----------------|----------|
| ----- | --- | ----- | ----- | ----- |
| JP 45025273 | B | 19700821 | JP 1967-50233 | 19670805 |

Abstract

The method for producing amino acid comprising 1) culturing in a medium containing methanol as a major carbon source a strain which belongs to the genus Achromobacter or Pseudomonas, has an ability to utilize methanol and has an ability to have amino acid accumulate, and 2) collecting the amino acid from the medium.

Language

Japanese

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨日本分類
36(2) D 25
36(2) D 35

日本国特許庁

⑩特許出願公告

昭45-25273

⑩特許公報

⑪公告 昭和45年(1970)8月21日

発明の数 1

(全6頁)

1

⑫発酵法によるアミノ酸の製造法

⑬特 願 昭42-50233
⑭出 願 昭42(1967)8月5日
⑮発 明 者 椎尾勇
鎌倉市佐助1の18
同 大塚慎一郎
横浜市中区山下町73
同 倉沢章伍
川崎市古川町7の3
同 内尾良輔
横浜市保土ヶ谷区善部町5
⑯出 願 人 味の素株式会社
東京都中央区宝町1の7
代 表 者 鈴木恭二

発明の詳細な説明

本発明は、メタノールを主炭素源とする培地に、メタノールを酸化してアミノ酸を生成蓄積する能力のある微生物を接種し、好氣的に培養して、培地中にアミノ酸を生成蓄積せしめ、之を採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法に係り、その目的とするところは安価かつ大量の供給が可能なメタノールを炭素源として用い、アミノ酸を工業的に有利に製造することにある。従来発酵法によるアミノ酸の製造においては、その炭素源を主として農産物に依存してきた。これら原料の生産量および価格によつてアミノ酸製造の経済性が大きく左右され、且つ、それ自体食品として、また食品加工原料として利用し得る農産物を発酵原料に使用することは、近い将来に予測される食糧問題に重大な影響を与えるものである。この点を補うものとして石油、炭化水素例えばケロシン、ナフサ、軽油、重油、メタン、ブタン、エタン等を用いる発酵法も知られているが、優秀な酸化性菌が得られないため、長期の培養時間を要する。また、これらの炭化水素は水に難溶のため、微生物による酸化を促進せしめるためには、水と

2

炭化水素の接触面積を広く保つための装置が必要である等、実用面の問題が多い。

本発明者は有機合成化学工業により大量かつ安価に得られるメタノールを主炭素源に利用することを試み、種々研究の結果、メタノールを炭素源としてアミノ酸を培地中に直接生成蓄積しうる微生物がアクロモバクター属及びシュードモナス属に属する細菌中に存在することを見出し本発明を完成した。

10 即ち本発明はメタノールを主炭素源とする培地に、アクロモバクター属またはシュードモナス属に属しメタノール酸化性、アミノ酸蓄積能を有する菌株を、接種培養し、アミノ酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法である。

メタノールを唯一の炭素源とする培地に生育しうる微生物の存在はすでに報告されているが、このメタノールを炭素源とするアミノ酸発酵は未だその例をみず、本発明をもつて嚆矢とする。

20 本発明において使用する微生物は、アクロモバクター属またはシュードモナス属に属し、メタノールを酸化してアミノ酸を生成蓄積する能力を有する菌株であるが、その代表的なものとして、アクロモバクター・メタノロフィラ(Achromobacter methanolophila nov. sp.)及びシュードモナス・インスエタ(Pseudomonas insueta nov. sp.)が挙げられる。そして、これらに属する株としてアクロモバクター・メタノロフィラF54-1、同F54-2(工発研菌寄第83号)、同F48-3、同F36-1、同F70-1、同E95-1、同E91-1、同E19-2及び同F73-1等が分離されており、又、シュードモナス・インスエタG8-3-2(工発研菌寄第84号)、同G4-1-2及び同F27-3等がある。

アクロモバクター・メタノロフィラ及びシュードモナス・インスエタの菌学的性質は次の通りである。

アクロモバクター・メタノロフィラ

細胞形態:

2%メタノール肉汁寒天斜面に30℃、18~24時間培養

0.4~0.6×1.0~1.4ミクロンの単独または二連鎖状の杆菌。運動性なし。グラム染色陰性。

2%メタノール肉汁寒天コロニー:

円形。平滑。周縁は全縁。隆起状。光沢あり。不透明。灰色がかつた白色または暗い褐色がかつた灰色。バター状。

合成メタノール寒天コロニー:

円形。平滑。全縁。扁平状ないし凸円状。光沢あり。白色ないし暗い褐色。バター状。培地がわずかに褐色になることがある。

2%メタノール肉汁寒天斜面:

中等度の生育。糸状。光沢あり。不透明。灰色がかつた白色。

合成メタノール寒天斜面:

中等度の生育。糸状。光沢あり。半透明。褐色がかつた灰色。

肉汁寒天斜面:生育しない。

2%メタノール肉汁:

もろい皮膜または菌環を形成する。わずかに濁る。

肉汁:生育しない。

ゼラケンの液化:液化しない。

硝酸塩の還元:

2%メタノール硝酸プロスより亜硝酸の生成はない。(菌株F36-1、F73-1はわずかに還元性を示す。)

酸の生成:

ヒュー・ライフソン(Hugh Leifson)の方法で、メタノールより徐々に酸を生成するが、エタノール、グリセロール、キシロース、グルコース、シクロコース、ラクトースよりの酸の生成はない。

メタノールを唯一の炭素源として発酵するが、エタノール、グルコース、酢酸、コハク酸、クエン酸は唯一の炭素源として発酵しない。

生育温度:

25℃~30℃で生育良好。42℃ではごくわずかに生育するかまたは生育しない。

分離源:野菜、果実。土壌。

本菌株は、上記の如く、グラム陰性の好気性杆菌で運動性を示さない、糖を発酵せずまた糖より酸

も生成しない、メタノールを唯一の炭素源として生育する、特徴を有しおり、バーヂーのマニュアル・オブ・デタミナティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第7版の分類と対比するに厳密に此と同意すべき菌株の記載なく、従つて新菌種に属するものと考え、該菌種をアクロモバクター・メタノロフィラと命名した。

シュードモナス・インスエタ

10 細胞形態:

2%メタノール肉汁寒天斜面に30℃、18~24時間培養

0.5×1.2~1.8ミクロンの杆菌。極鞭毛により運動する。グラム染色陰性。

15 2%メタノール肉汁寒天コロニー:

コロニーは小さい。円形。平滑。全縁。隆起状。光沢あり。半透明。暗い黄色がかつた灰色。バター状。

合成メタノール寒天コロニー:生育不良。

20 2%メタノール肉汁寒天斜面:

中等度の生育。糸状。光沢なし。不透明。灰色がかつた白色。

合成メタノール寒天斜面:生育中等度。

肉汁斜面:生育しない。

25 2%メタノール肉汁:中等度の濁りあり。沈渣を形成する。

ゼラチンの液化:液化しない。

硝酸塩の還元:2%メタノール硝酸プロスより亜硝酸を生成する。

30 酸の生成:

ヒュー・ライフソン(Hugh Laifson)の方法で、メタノール、キシロース、グルコース、シクロコース、ラクトースよりゆつくり酸を生成する。グリセロールより酸の生成はない。

35 メタノールを唯一の炭素源として発酵するが、エタノール、グルコース、酢酸、コハク酸、クエン酸は唯一の炭素源として発酵しない。

生育温度:25℃~30℃で生育良好。

37℃で生育不良または中等度

40 分離源:土壌、野菜。

本菌株は上記の如く、グラム陰性の好気性杆菌で極鞭毛を有し運動する、メタノールを唯一の炭素源として利用し、メタノールや、グルコースなどの糖よりゆつくり酸を形成する、しかしメタノールを含まない肉汁寒天に生育しない特徴を有し

45

ている、また本菌株は既知のメタノール酸化性菌のように赤色色素と生成しない、という特徴を有し、バージーのマニュアル・オブ・デタミナティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第7版の分類と対比するに厳密に此と同定し得る菌株の記載なく、従つて新菌株に属するものと考え、該菌株をシュードモナス・インスエタと命名した。

実験方法は何れも次の如き方法を用いた。

ゼラチンの液化:

2%メタノール、0.4%ゼラチンを含む肉汁寒天培地に9日間培養し、フレイガー(Fraiger)法により検出。

メタノール等の酸化性: 下記組成の培地にメタノールその他の被験体炭素源を唯一の炭素源として加え、30℃で5日間培養。

硝酸二カルウム 1.0 g、硝酸アンモニウム 1.0 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、塩化カルウム 0.2 g、蒸留水 1 L、PH 7.0

硝酸塩の還元: 硝酸グロス(Difco)にメタノールを2%加え30℃で9日間培養。1, 3, 5, 7日後に亜硝酸の検出テストを行う。

合成メタノール培地

| | |
|----------|----------|
| メタノール | 2% (V/V) |
| 硫酸アンモニウム | 5 g |
| 塩化ナトリウム | 0.5 g |
| 硫酸マグネシウム | 0.2 g |
| 硫酸第一鉄 | 0.01 g |
| 硫酸マンガ | 0.008 g |
| 硝酸一カルウム | 2 g |
| イースト・エキス | 0.2 g |
| 蒸留水 | 1 L |

PH 7.0

発酵に使用する培地の組成としては、主炭素源としてのメタノール、窒素源、無機物、ビタミンその他の生長促進物質を程よく含有する培地ならば、合成培地または天然培地何れでも使用可能である。

培地の炭素源としてはメタノールを使用するが、濃度等について種々の条件が必要である。メタノールは高濃度では微生物の生育を阻害するので培養中は高濃度を維持してはいけないことは明らかである。従つて最初に添加したメタノールのみで培養を終了させることも出来るが、低濃度で出発しメタノールの消費に合わせてフィードすることは良いことである。

培地の窒素源としては使用菌の利用可能な物質なら全て使用できるが、その種類は使用菌に応じて適当に選択される。

通常、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム等のアンモニウム塩、アンモニア、尿素また硝酸カルウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等の硝酸塩等を0.2~4%程度の濃度において使用した場合に良好な結果が得られる。

炭素源、窒素源の他に培地には必要に応じて無機物としてリン酸カルウム、硫酸マグネシウム、鉄、マンガ、亜鉛、モリブデンイオン等を、また生長促進物質として、ビタミンB₁、ビオチン、パントテン酸、ビタミンB₁₂等のビタミン類、メチオニン、システイン等のアミノ酸またはそれら

を含有する「味液」(商標)等の大豆蛋白加水分解液、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン分解液、麦芽汁等の天然有機物等を添加する。また、使用菌が栄養要求性株である場合には、栄養要求物質を適量添加することが必要である。培養温度は20~40℃で培地のPHを4~9に保持し、通常1~3日間振盪培養等の好気的条件下で培養を行う。培養中にアミノ酸その他の有機酸が生成し、又窒素源としてアンモニウム塩を使用するときは、アンモニアがアミノ酸、菌体生成のために消費されるため、培養液のPHが若しく低下する。従つて好適なPHを保持するためには、あらかじめ炭酸カルシウム、PH緩衝塩を添加するか、培養途上でアンモニア、苛性ソーダ等のアルカリを添加する。

培養終了後、菌体を除去し、以下、イオン交換法、濃縮晶析法等常法に従い生成蓄積したアミノ酸を単離する。

以下実施例により説明する。

実施例 1

| | |
|----------|---------|
| メタノール | 35 ml |
| 硫酸アンモニウム | 15 g |
| 硝酸一カルウム | 2 g |
| 硫酸マグネシウム | 0.2 g |
| 塩化ナトリウム | 0.5 g |
| 硫酸マンガ | 0.008 g |
| 硫酸第一鉄 | 0.01 g |
| 炭酸カルシウム | 25 g |
| 蒸留水 | 1 L |

PH 7.0

上記の組成の培地 4 mlを試験管に分注し、第1

表に列挙した各菌株を接種し、30℃で2日間好 常に示した如き量のグルタミン酸が生成蓄積した。
 氣的に振盪培養を行つたところ、それぞれ第1表※

第 1 表

| 使 用 菌 | グルタミン 酸生成量 (mg/ℓ) |
|-------------------------|-------------------------|
| アクロモバクター・メタノーロフィラ E95-1 | 310 |
| " " E91-1 | 350 |
| " " F48-3 | 100 |
| " " E19-2 | 300 |
| " " F73-1 | 300 |
| シュードモナス・インスエタ G8-3-2 | 146 |
| " " G4-1-2 | 280 |
| " " F27-3 | 230 |

実施例 2

実施例1に示した組成の培地に更に1ℓ当り *オアツセイを行つたところ、夫々第2表に示した
 0.2gの酵母エキスを添加した培地10mlにシュ 20 如き量のアミノ酸が蓄積していた。(実施例記載
 ードモナス・インスエタG8-3-2、F27- の生成アミノ酸量はすべて培地中に含有している
 3、G4-1-2、アクロモバクター・メタノー アミノ酸量を差引いて表示した。以下の実施例に
 ロフィラF73-1菌を夫々接種し30℃で2日 おいても同じ。)
 間試験管振盪培養を行つた。培養液についてバイ*

25

第 2 表

アミノ酸生成量 (mg/ℓ)

| 使 用 菌 | グ ル タ ミ ン 酸 | リ ジ ン | グ リ シ ン | アルギニン | フェニル アラニン |
|----------------------------|----------------|-------|---------|-------|--------------|
| アクロモバクター・ メタノーロフィラF73-1 | | | | | 17 |
| シュードモナス・ インスエタ G8-3-2 | 466 | | 23 | 13 | |
| " " F27-3 | 335 | | | | 31 |
| " " G4-1-2 | | 11.6 | | | |

40

実施例 3

実施例1に示した組成の培地に更に1ℓ当り

| | | | |
|---------|--------|-------------|--------|
| チアミン塩酸塩 | 1000μg | パントテン酸カルシウム | 1000μg |
| リボフラビン | 1000μg | ニコチン酸 | 1000μg |
| ビリドキシン | 1000μg | パラ・アミノ安息香酸 | 200μg |
| | | ビ オ チ ン | 2μg |
| | | 葉 酸 | 50μg |

「味 液」 2 ml ※ ころ、それぞれ第3表に示した如き量のグルタミン酸を添加した培地に、表に列挙した各種微生物を接種し 30℃で2日間好氣的に振盪培養を行つたと※

第 3 表

| 使 用 菌 | グルタミン酸生成量 (mg/L) |
|------------------------|---------------------|
| アクロモバクター・メタノロフィラ F54-2 | 100 |
| " " E95-1 | 605 |
| " " E91-1 | 565 |
| " " F36-1 | 90 |
| " " E19-2 | 260 |
| " " F73-1 | 270 |
| シュードモナス・インスエタ F27-3 | 425 |
| " " G8-3-2 | 690 |

実施例 4

実施例3におけると同じ培地にアクロモバクター * し、30℃で2日間振盪培養を行つた際の培養液 - ・メタノロフィラ E19-2、F73-1、 中の各種アミノ酸の蓄積量は第4表の通りである。シュードモナス・インスエタ F27-3 菌を接種 *

第 4 表

| 菌 名 アミノ酸 | シュードモナス F27-3 | アクロモバクター E19-2 | アクロモバクター F73-1 |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|
| アラニン | 117 mg/L | | |
| イソロイシン | 45 " | | 82 mg/L |
| ロイシン | 125 " | | 171 " |
| スレオニン | 11 " | | 21 " |
| バリン | | 314 mg/L | |
| プロリン | 17 " | 23 " | |
| チロシン | 9 " | 5 " | |

実施例 5

実施例3におけると同じ培地にアクロモバクター ☆ し、30℃で2日間振盪培養したところ、培養液 - ・メタノロフィラ F54-2、F48-3、 中に次のアミノ酸が蓄積していた。シュードモナス・インスエタ F27-3 菌を接種 ☆

第 5 表

| 菌 名 | アミノ酸蓄積量 |
|------------------------|---------------|
| アクロモバクター・メタノロフィラ F54-2 | アラニン 187 mg/L |
| " " F48-3 | セリン 81 " |
| シュードモナス・インスエタ F27-3 | バリン 136 " |

11

特許請求の範囲

1 メタノールを主炭素源とする培地に、アクロモバクター属またはシユードモナス属に属し、メタノール還元性、アミノ酸蓄積能を有する菌株を

12

接種、培養し、アミノ酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法。